云　南　植　物　研　究　2009, 31 (1): 35～41
Acta Botanica Yunnanica　DOI: 10.3724 SP.J.1143.2009.08076

西双版纳地区流苏石斛遗传多样性的 ISSR 分析

马佳梅[1,2], 殷寿华[1]

(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊　666303; 2 中国科学院研究生院, 北京　100049)

摘要: 采用 ISSR 分子标记技术, 对西双版纳分布的兰科濒危植物流苏石斛 (*Dendrobium fimbriatum*) 5 个居群共 114 个个体的遗传多样性进行了研究。从 100 条引物中筛选出了 12 条用于扩增, 共检测到 117 个位点, 其中 105 个为多态位点。分析结果表明, 流苏石斛居群水平遗传多样性较低。在物种水平上, 流苏石斛多态位点百分率 *PPB* 为 89.74%, Nei's 基因多样性指数 *H* 为 0.3227, Shannon's 多样性信息指数 H_{sp} 为 0.4779; 在居群水平上, 各个居群的多态位点百分率 *PPB* 差异较大 (6.84%～39.32%), 平均值为 23.93%, Nei's 基因多样性指数 *H* 为 0.0871, 各个居群的 Shannon's 多样性信息指数 H_o 平均为 0.1290。AMOVA 分析的结果显示, 流苏石斛的遗传变异大多数存在于居群间, 占总遗传变异的 74.79%。基于 Nei's 遗传多样性分析得出的居群间遗传分化系数 $G_{st}=0.7443$。各居群间的 Nei's 遗传一致度 (*I*) 范围为 0.5882～0.8331。Mantel 检测发现, 居群间的遗传距离和地理距离之间无显著的正相关关系 ($r=0.2419$, $P=0.2416$)。鉴于流苏石斛的遗传多样性现状和居群遗传结构, 我们建议对流苏石斛居群所有个体实施及时的就地保护, 同时建立迁地保护居群, 促进基因交流。

关键词: 流苏石斛; ISSR; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: Q 78　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0253-2700 (2009) 01-035-07

Genetic Diversity of *Dendrobium fimbriatum* (Orchidaceae), an Endangered Species, Detected by Inter-simple Sequence Repeat (ISSR)

MA Jia-Mei[1,2], YIN Shou-Hua[1**]

(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Science*, Mengla 666303, China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Science*, Beijing 100049, China)

Abstract: The genetic variability of five populations from xishuangbanna were investigated using inter-simple sequence repeat (ISSR). A total of 117 unambiguous and repetitious bands were obtained from 114 individuals of sampled populations using twelve primers selected. The results showed that *Dendrobium fimbriatum* exhibited a relatively low genetic diversity at population level. At species level, the value of the average percentage of polymorphic bands (*PPB*) was 89.74%, expected heterozygosity (*H*) was 0.3227, Shannon's Information index (H_{sp}) was 0.4779; while at population level, the value of the average percentage of polymorphic bands (*PPB*) was 23.93%, expected heterozygosity (*H*) was 0.0871, Shannon's Information index (Ho) was 0.1290. Most of genetic variation partitioned among populations (74.79%). The coefficient of gene differentiation among populations (G_{st}) was 0.7443 showed that genetic diafferentiation among population based on Nei's genetic distance had a high degree. Pairwise genetic identity (*I*) among populations ranged from 0.5882 to 0.8331. No significant correlation was found between geographical and genetic distance. Based on the findings

基金项目: 中科院-云南合作重大专项 (2000WK-07) ——物种保存与植物园可持续发展能力建设子课题
通讯作者: Author for correspondence; E-mail: ysh@xtbg.org.cn
收稿日期: 2008-04-29, 2008-08-15 接受发表
作者简介: 马佳梅 (1981-) 女, 在读硕士研究生, 主要从事保护生物学研究。

in present study, we proposed that conservation management of *Dendrobium fimbriatum* shoud include protection of nature habitats occupied by all five wild populations and preservation of germplasm in botanical gardens from multiple seed sources to accelerate the gene flow .

Key words: *Dendrobium fimbriatum*; ISSR; Genetic diversity; Genetic structure

流苏石斛（*Dendrobium fimbriatum* Hook .）为兰科石斛属多年生附生植物，产我国及东南亚各国。生于海拔 600～1 700 m 的密林树干上或山谷阴湿岩石上（郎楷永等，1999）。流苏石斛为中药石斛的来源之一，具有很高的观赏和药用价值。

由于流苏石斛自身的生长、繁殖特性和对生长环境的特殊要求以及近年来人们的过度采挖等原因，流苏石斛野生资源已接近枯竭，被列为国家重点保护植物。如不加强保护，流苏石斛的野生资源极易丧失（刘强等，2007）。

流苏石斛的研究多集中在化学成分分析（毕志明等，2001a，b），组培（付志惠等，2006）及用分子标记技术进行石斛属种间的鉴别（Li 等，2004，2005）等，但尚未见流苏石斛传粉及遗传多样性方面的研究。

本文采用 ISSR 分子标记技术对西双版纳地区分布的野生流苏石斛居群进行了研究，探讨其居群遗传多样性水平和遗传结构，为科学合理地利用和保护现有的野生流苏石斛资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

材料采集于西双版纳境内的曼丕、绿石林、银厂、红石崖、勐醒等地共 5 个居群 114 个样本。采样时，对个体数大于 30 株的居群就按照均匀分布、随机取样的原则进行采样，而对于个体数少于 30 株的居群尽量采集所有样本。分别采集新鲜、幼嫩叶片，用硅胶将其迅速干燥后低温保存。记录各居群的海拔、经纬度（表 1）。

1.2 DNA 的提取

流苏石斛总 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法（Doyle and Doyle，1987），1% 琼脂糖凝胶电泳检测，据相对的 EB 染色荧光强度，对总 DNA 的浓度进行粗略估算，最终 DNA 模板浓度定量在 2.5～5 ng μl，放冰箱备用。

1.3 引物筛选与 PCR 扩增

从每个居群选取 2 个 DNA 样品，从哥伦比亚大学设计（上海生工合成）的第 9 套 100 个引物中筛选出扩增条带清晰、重复性和稳定性好、条带相对较多的引物 12 条（表 2），用这些引物对所有个体进行 PCR 扩增及统计分析。

PCR 反应在 ABI 2720 Thermal Cycler PCR 仪上进行。在 20 μl 反应体系中含 1×buffer、2.0 mmol L Mg^{2+}、1.0 mmol L dNTPs、1.0 μmol L 引物、1.0 U *Taq* DNA 聚合酶（TAKARA，宝生物工程（大连）有限公司）、10 ng 模板 DNA。

扩增程序为：94℃预变性 5 min；94℃变性 45 s，退火 45 s（退火温度随引物而定，表 2），72℃延伸 45 s，共 35 个循环；最后 72℃延伸 7 min。电泳条件：1.5%的琼脂糖凝胶上电泳（1.0×TAE，80 V）分离，以 100 bp DNA Marker（100～3 000 bp）（博大生物工程有限公司）为分子标记，溴化乙啶（EB）染色显带。DNA 片段通过凝胶成像系统（GelDoc-It Imaging System）观察记录。

1.4 数据统计分析

依据 DNA Marker 判读电泳图谱中扩增产物的有无及其分子量大小，将电泳图谱中清晰的条带记作“1”，否则记作“0”，并输入计算机，构成 0 1 数据矩阵。应用 POPGENE1.31（Yeh and Yang，1999）软件在假定种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下进行遗传分析，分别计算了多态位点百分率（*PPB*）、平均每个位点的观测等位基因数（N_a）、平均每个位点的有效等位基因数（N_e）、Nei′s 基因多样性指数（*H*）、Shannon′s 多样性信息指数（H_o，在物种水平上为 H_{sp}，在居群水平上为 H_{pop}）、总的基因多样性（H_t）、居群内平均基因多样性（H_s）、遗传分化系数（G_{st}）、Nei′s 遗传距离（*D*）和遗传一致度（*I*）。根据 POPGENE 计算得到的 Nei′s 遗传距离和遗传一致度，

表 1 五个流苏石斛野生居群信息

Table 1 Information of Populations of *Dendrobium fimbriatum*

居群 Population	居群大小 Population size	采样数 Sample size	海拔 Altitude (m)	纬度 Latitude	经度 Longtitude
曼丕 MP	28	28	920	22°00′47″N	101°27′45″E
绿石林 LSL	60	30	660	21°54′34″N	101°17′04″E
银厂 YC	50	30	1170	21°58′56″N	101°13′26″E
红石崖 HSA	18	18	765	21°55′13″N	101°22′56″E
勐醒 MX	10	8	700	21°52′37″N	101°38′49″E

表 2　用于流苏石斛 5 个居群扩增的 ISSR 引物

Table 2　ISSR primers used for generating ISSR bands of *Dendrobium fimbriatum* populations

引物 Primer	序列 Sequence (5′-3′)	扩增条带数 No. of bands amplied	条带大小 Range of bands (bp)	退火温度 Annealing temperature (℃)
810	$(GA)_8T$	8	180 - 700	52
811	$(GA)_8C$	13	180 - 1200	51
818	$(CA)_8G$	9	200 - 900	51
825	$(AC)_8T$	8	380 - 900	46
834	$(AG)_8YT$	11	180 - 900	50
836	$(AG)_8YA$	11	180 - 650	50
840	$(GA)_8YT$	12	150 - 700	50
846	$(CA)_8RT$	10	200 - 900	50
880	GGA GAG GAG AGG AGA	14	150 - 1200	50
884	HBH $(AG)_7$	7	200 - 650	52
887	DVD $(TC)_7$	7	200 - 750	52
900	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	8	200 - 650	52

Y = (C, T); B = (C, G, T); D = (A, G, T); H = (A, C, T); R = (A, G); V = (A, C, G)

运用 NTSYSpc2.10e 软件的 UPGMA 方法进行聚类，构建各居群之间的遗传关系。运用 DCFA1.1 (张富民和葛颂，2001) 对表型数据矩阵进行计算，得到表型间的距离系数，组成 WINAMOVA 所需的距离文件 (.dis)，然后运用 AMOVA 软件 (Excoffer, 1993) 对居群间和居群内的遗传变异进行分子变异分析 (张富民和葛颂，2002)。得出变异组分、变异百分率、遗传分化参数 Φ_{st}。运用 TFPGA1.3 (Miller, 1997) Mantel 检测居群间的遗传距离和地理距离间的相关性 (置换 3 000 次)。

2　结果

2.1　居群遗传多样性

用筛选出的 12 条引物对流苏石斛的 5 个居群共 114 个个体进行扩增，共检测到 117 个清晰、可重复的有效位点，其中多态位点有 105 个。在物种水平上，流苏石斛多态位点百分率 *PPB* 为 89.74% (表 3)、Nei′s 基因多样性指数 *H* 为 0.3227 (±0.1715)、Shannon′s 多样性信息指数 H_{sp} 为 0.4779 (±0.2304)、平均每个位点的有效等位基因数 N_e 为 1.5610 (±0.3445) (表 4)；在居群水平上，各个居群的多态位点百分率 *PPB* 差异较大 (6.84～39.32%)，平均值为 23.93% (表 3)，Nei′s 基因多样性指数 *H* 为 0.0871 (±0.1598)，各个居群的 Shannon′s 多样性信息指数 H_o 平均为 0.1290 (±0.2312)，平均每个位点的有效等位基因数 N_e 为 1.1514 (±0.2911)。

表 3　流苏石斛各居群的多态位点百分率 (*PPB*) 统计

Table 3　The *PPB* statistics of *Dendrobium fimbriatum* populations

居群 Population	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率 PPB (%)
勐醒 MX	8	6.84
银厂 YC	46	39.32
绿石林 LSL	27	23.08
曼丕 MP	33	28.21
红石崖 HSY	26	22.22
平均 Mean	28	23.93
物种水平 At species level	105	89.74

PPB, the average percentage of polymorphic bands

表 4　流苏石斛居群的遗传多样性统计

Table 4　The genetic variation within population of *Dendrobium fimbriatum*

居群 Population	观测等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Nei′s 基因多样性 H	Shannon′s 信息指数 H_o
勐醒 MX	1.0684±0.2535	1.0365±0.1603	0.0217±0.0891	0.0330±0.1309
银厂 YC	1.3932±0.4906	1.2508±0.3674	0.1433±0.1982	0.2121±0.2842
绿石林 LSL	1.2308±0.4231	1.1455±0.3037	0.0836±0.1665	0.1239±0.2404
曼丕 MP	1.2821±0.4519	1.1820±0.3364	0.1030±0.1818	0.1519±0.2607
红石崖 HSY	1.2222±0.4175	1.1422±0.2878	0.0837±0.1632	0.1241±0.2399
平均 Mean	1.2271±0.4073	1.1514±0.2911	0.0871±0.1598	0.1290±0.2312
物种水平 At species level	1.8974±0.3047	1.5610±0.3445	0.3227±0.1715	0.4779±0.2304

N_a, Observed number of alleles; N_e, Efective number of alleles; H, Nei′s (1973) gene diversity; H_o, Shannon′s information index

2.2 居群间遗传分化

用 POPGENE 软件计算出的遗传变异分析结果（表 5）表明：Nei′s 基因分化系数 G_{st} = 0.7443，表明有 74.43%的遗传变异存在于居群间，25.57%的遗传变异存在于居群内，居群间的遗传分化大于居群内的遗传分化。AMOVA 的分析结果也显示流苏石斛的遗传变异主要存在于居群间，占总变异的 74.79%（P < 0.001）（表 6），Φ_{st} = 0.748。两种分析方法得到的遗传分化比较一致，即表明了遗传变异主要存在于居群间，居群间的遗传分化大于居群内的遗传分化。

2.3 居群间遗传距离和遗传一致度

用 POPGENE 计算出了流苏石斛 5 个居群两两居群间的 Nei′s 遗传一致度（I）范围为 0.5882～0.8331；遗传距离（D）的范围为 0.1842～0.5307（表 7）。据其两两居群间的遗传一致度进行 UPGMA 聚类（图 1）。曼丕（MP）和红石崖（HSY）居群间的遗传一致度最高（I = 0.8331），遗传距离最近（D = 0.1842），同时在 UPGMA 聚类图中也聚在了一起（图 1）；勐醒（MX）和红石崖（HSY）居群聚为一支，遗传一致度和遗传

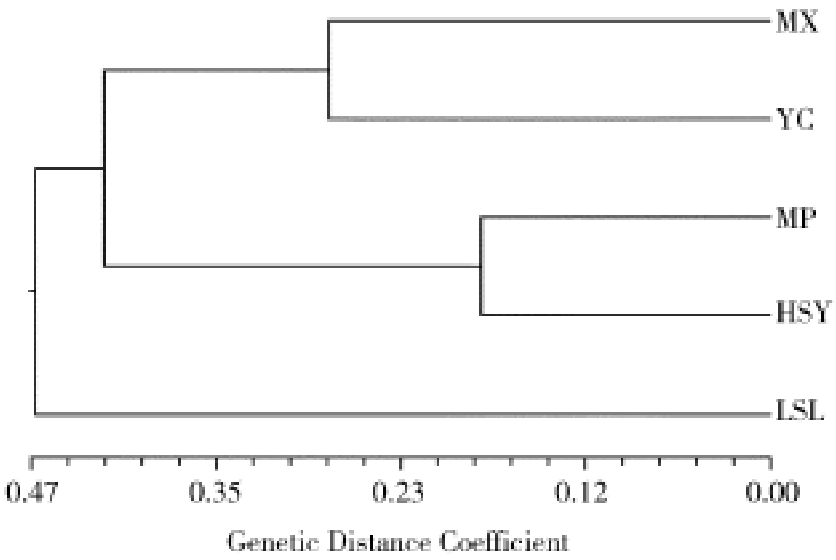


图 1 流苏石斛居群基于 Nei′s 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 Dendrogram of UPGMA cluster analysis among *Dendrobium fimbriatum* populations based on Nei′s genetic distance

表 5 流苏石斛遗传多样性 Nei′s 分析

Table 5 Nei′s (1987) analysis of gene divercity in *Dendrobium fimbriatum* populations

	总基因多样性 H_t	居群内基因多样性 H_s	基因分化系数 G_{st}	基因流 N_m
平均 Mean	0.3276	0.0871	0.7443	0.1810
标准差 Standdrd deviation	0.0274	0.0067		

H_t, Total gene diversity; H_s, Gene diversity within populations; G_{st}, Coeficient of gene differentiation; N_m, Gene flow, $N_m = 0.5\ (1-G_{st})\ G_{st}$ (McDermott and McDonald, 1993)

表 6 流苏石斛居群的 AMOVA 分析

Table 6 AMOVA analysis of *Dendrobium fimbriatum* populations

变异来源 Source of variance	方差总和 SSD	平均方差 MSD	变异组分 Variance component	变异百分率 Variance (%)	P^*
居群间 Variance among populations	1470.0200	367.505	16.4656	74.79	< 0.001
居群内 Variance within populations	605.0151	5.551	5.5505	25.21	< 0.001

SSD, Sum of squared deviation; MSD, Mean of squared deviation; * P-values, The probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone

表 7 流苏石斛 5 个居群间 Nei′s (1978) 遗传一致度（对角线上方）和遗传距离（对角线下方）

Table 7 Nei′s genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among *Dendrobium fimbriatum* populations

	勐醒 MX	银厂 YC	绿石林 LSL	曼丕 MP	红石崖 HSY
勐醒 MX	****	0.7552	0.5882	0.6400	0.5991
银厂 YC	0.2808	****	0.6921	0.7175	0.6658
绿石林 LSL	0.5307	0.3680	****	0.6333	0.5971
曼丕 MP	0.4464	0.3319	0.4568	****	0.8318
红石崖 HSY	0.5123	0.4068	0.5157	0.1842	****

距离分别为 0.5991 和 0.5123。勐醒（MX）和绿石林（LSL）居群间的遗传一致度最低（$I = 0.5882$），遗传距离最远（$D = 0.5307$）。在 UPGMA 聚类图中绿石林（LSL）居群位于最基部（图 1）。

经 TFPGA1.3 Mantel 检测，居群间的遗传距离和地理距离的相关性系数 $r = 0.2419$（$P = 0.2416 > 0.05$）。结果表明，流苏石斛 5 个居群的遗传距离和地理距离不存在显著的相关性。

3 讨论

3.1 居群遗传结构分析

Nybom (2004) 统计了基于 ISSR 位点分析物种的 Shannon's 多样性指数 $H_o = 0.22$，远高于流苏石斛相应指数；李昂和葛颂（2002）研究得到的硬叶兜兰和独花兰的 Shannon's 多样性指数分别为 $H_o = 0.2204$ 和 $H_o = 0.1810$，认为均低于远交兰花的平均水平；高丽和杨波（2006）研究得到的春兰的 Shannon's 多样性指数为 $H_o = 0.2958$。本研究得到的流苏石斛居群水平相应的遗传参数低于以上几种兰花。

Hamrick and Loveless (1989) 指出，一个物种的遗传多样性高低是与它的生活史特征和生态特性分不开的，广布、异交和动物传播种子都会使得物种有较高的遗传多样性。

我们采样过程中观察发现，野生流苏石斛的分布大量减少，且每个居群内数量也很少，尤其是勐醒居群，在勐醒发现的流苏石斛只有十株，且间距很大，估计是村民采集遗留下来的（有两株无法采到），其它几个居群数量也不是很大。小居群产生的遗传漂变可能是导致其遗传多样性较低的一个原因。随着橡胶种植面积的逐年扩大，生境破碎化的进程也随之加快。对照李红梅等（2005）所作的橡胶林面积的增大图，有流苏石斛分布的山地都是橡胶种植的主要区域；加上该物种分布的海拔高度也恰恰是橡胶种植的适合范围，再加上其对小生境的要求比较苛刻，这些都加速了流苏石斛居群的片段化，这也可能是遗传多样性丧失的另一个原因。

在自然条件下，流苏石斛主要以营养繁殖和通过种子进行有性繁殖两种方式进行繁衍。流苏石斛可以通过种子进行繁殖，但野生流苏石斛结实率非常低，在对西双版纳州石灰岩的流苏石斛种群的观测可知，它的结实率仅为 0.5% 左右；虽然一个成熟的果实内藏有种子上万粒，但其种子细小如粉尘，种皮内只含有未分化完全的胚，几乎不含任何营养物质，在自然状态下的种子萌发缺乏营养物质来源，需要借助与菌根真菌共生来获取养分，才能萌发长成幼苗（陈心启和罗毅波，2003）。因此，在自然状态下流苏石斛通过种子进行繁殖是极为困难的，这是流苏石斛自然繁殖率低和野生资源稀少的一个原因（刘强等，2007）。因此我们推断流苏石斛居群的片段化以及繁殖特性，可能是导致其居群水平的遗传多样性较低的原因。

Bussell (1999) 曾对 35 个物种的 RAPD 分析结果进行了总结，发现 29 个异交物种的居群间遗传变异占总的遗传变异的比率范围为 0.9%～41.3%，6 个近交物种的范围为 44.8%～66.9%（Dawson 等，1993，1995；Bonnin 等，1996；Russell 等，1993）。Hogbin and Peakall (1999) 也总结了 7 个物种的 RAPD 分析结果，发现异交物种的遗传变异存在于居群内，而居群间的遗传变异通常不足 27.1%。根据本研究采用两种方法对流苏石斛的遗传分化进行分析，Nei's 基因分化系数 $G_{st} = 0.7343$，AMOVA 分析 $\Phi_{st} = 0.748$，均表明流苏石斛具有较高的遗传分化水平。我们可以认为该物种的遗传变异主要存在于居群间。我们通过野外观测和初步人工授粉等实验，发现该物种自交不亲和（结实率为 0），同居群内的异交结实率为 58.6%，不同居群间异交物种结实率为 71.4%（未发表），我们推测该物种属于异交种，但野外观测过程中，未发现有传粉昆虫（可能是因为环境破坏，导致其传粉昆虫消失或者其他原因），且其居群自然结实率很低。由于传粉昆虫缺乏及其种子特性，都严重制约了流苏石斛的天然更新，因此我们认为该物种主要靠无性繁殖维持居群大小，这可能是其居群间遗传分化程度较高的一个原因。Wright (1951) 指出，如果 $N_m < 1$，则由于遗传漂变可导致居群间明显的遗传分化。若基因流受到限制，在短距离内就可出现居群间的遗传分化（Heywood，1991）。本研究得出得流苏石斛的基因流 $N_m = 0.1810$，远远小于 1，较低的基因流更加剧了流苏石斛居群间的遗传分

化。Nybom (2000) 统计了基于 RAPD 位点分析的 78 个 Φ_{st} 结果和 31 个 G_{st} 结果进行总结，认为远交物种居群间遗传多样性高低与取样居群间最大地理距离有很大的相关性，而本研究仅仅对西双版纳地区的流苏石斛进行取样，居群间距离最多不超过 50 km，这种取样的局限性可能是导致居群间遗传分化程度较高的又一原因。Mantel 检测表明，流苏石斛居群的遗传距离和地理距离不存在显著的相关性，说明地理距离对遗传分化影响不明显。

3.2 流苏石斛居群的保护建议

根据本研究的结果，流苏石斛居群内遗传多样性水平较低，而居群间遗传分化程度很高，我们推测其濒危的现状是由于其对生境的特殊要求、生长繁殖特性和生境片段化（橡胶林的大面积种植）、人为干扰（人类的大量采集）等多方面原因造成的。遗传多样性对于物种的生存和发展具有决定性作用，物种保护策略的制定必须建立在对种群遗传结构及多样性充分了解的基础上 (Reed and Frankham, 2003)。基于对流苏石斛居群遗传结构的分析，建议采取下列保护措施：(1) 本研究结果表明，各流苏石斛居群遗传多样较低，遗传分化明显，应对流苏石斛所有居群的全部个体实施及时的就地保护，尤其是遗传多样性较高的银厂居群，最大限度的保存各居群的遗传多样性；(2) 建议应尽可能在所有居群中取样，建立迁地保护基地，通过人工传粉等促进基因交流，利用种子进行繁殖，最大限度的保持流苏石斛的遗传多样性；(3) 及时将迁地保护区的幼苗回归到野外居群中，以补充野外居群的数量，对流苏石斛的回归需要通过对其传粉生物学等有关其基本生物学特性的进一步研究和野外实地实验等，来判定其有无回归和复壮的能力；(4) 采用植物组织培养技术，进行流苏石斛的快速繁殖，建立人工栽培基地，缓解人们对野生资源的依赖。

致谢　本项研究的野外考察与采样阶段得到了刘强老师的大力支持；在实验过程中，得到了陈茂盛老师的耐心指导；同时还得到了慈秀芹、李增加等同学的积极帮助。

〔参 考 文 献〕

郎楷永，陈心启，吉占和，1999. 中国植物志 (17～19 卷) [M]. 北京：科学出版社

Ammiraju JSS, Dholakia BB, Santra DK *et al.*, 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 102 (5): 726—732

Bi ZM (毕志明), Yang YS (杨毅生), Wang ZT (王峥涛) *et al.*, 2001a. Chemical Constituents of *Dendrobium fimbriatum* Hook. (I) [J]. *Journal of China Pharmaceutical University* (中国药科大学学报), 32 (3): 200—202

Bi ZM (毕志明), Wang ZT (王峥涛), Zhang M (张勉) *et al.*, 2001b. Chemical Constituents of *Dendrobium fimbriatum* Hook. (Ⅱ) [J]. *Journal of China Pharmaceutical University* (中国药科大学学报), 32 (6): 421—422

Blair MW, Panaud O, Mccouch SR, 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (5): 780—792

Bonnin I, Huguet T, Gherardi M *et al.*, 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncculata* (Leguminosae), shown using RAPD markers [J]. *American Journal of Botany*, 83: 843—855

Bussell JD, 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeiaceae) [J]. *Molecular Ecology*, 8 (5): 775—789

Chen SC (陈心启), Luo YB (罗毅波), 2003. Advance in some plant groups in China Ⅰ. A retrospdct and prospect of orchidology in China [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 45 (增刊): 2—20

Dawson IK, Chalmers KJ, Waugh R *et al.*, 1993. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers [J]. *Molecular Ecology*, 2: 151—159

Dawson IK, Simons AJ, Waugh R *et al.*, 1995. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays [J]. *Heredity*, 74: 10—18

Dirlewanger E, Pronier V, Parvery C *et al.*, 1998. Genetic linkage map of peach (*Prunus persica* L.) using morphological and molecular markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 (5-6): 888—895

Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11—15

Esselman EJ, Li JQ, Crawford DJ *et al.*, 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and RAPD and ISSR markers [J]. *Molecular Ecology*, 8 (3): 443—451

Excoffier L, 1993. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) Version 1.55 [M]. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, 2002. Introduction to Conservation Genetics [M]. UK: Cambridge University Press

Fu ZH (付志惠), Li HL (李洪林), Yang B (杨波), 2006. Tissue Culture of *Dendrobium fimbriatum* Hook. [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 42 (4): 690—690

Gao L (高丽), Yang B (杨波), 2006. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), 14 (3): 250—257

Gilbert JE, Lewis RB, Wilkinson MJ *et al.*, 1999. Developing an appropriate strategy to access genetic variability in plant germplasm collections [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (6-7): 1125—1131

Hamrick JL, Loveless MD, 1989. The genetic structure of tropical tree populations: Associations with reproductive biology [A]. In: Bock JH, Linhart YB (eds), Plant Evolutionary Ecology [M]. Boulder: Westview Press

Heywood JS, 1991. Spatial-analysis of genetic-variation in plant-populations [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 335—355

Hogbin PM, Peakall R, 1999. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrate* [J]. *Conservation Biology*, 13 (3): 514—522

Li A (李昂), Ge S (葛颂), 2002. Advances in plant conservation genetic [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), 10 (1): 61—71

Li A (李昂), Luo YB (罗毅波), Xiong ZT (熊治廷) *et al.*, 2002. A preliminary study on conservation genetics of three endangered orchid species [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 44 (2): 250—252

Li TX, Wang JK, Bai YF *et al.*, 2004. A novel method for screening species-specific gDNA probes for species identification [J]. *Nucleic Acids Research*, 32 (4): e45

Li TX, Wang JK, Lu ZH, 2005. Accurate identification of closely related Dendrobium species with multiple species-specific gDNA probes [J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 62 (2): 111—123

Liu Q (刘强), Yin SH (殷寿华), Huang W (黄文) *et al.*, 2007. Studies on the endangerment reasons and conservation strategies for *Dendrobium fimbriatum* Hook. [J]. *Subtropical Plant Science* (亚热带植物科学), 36 (4): 45—47

Miller MP, 1997. Tools for Population Genetics Analysis (TFPGA), Version 1.3, Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff

Moreno S, Martin JP, Ortiz M, 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm [J]. *Euphytica*, 101 (1): 117—125

Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 70: 3321—3323

Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 89: 583—590

Nei M, 2004. Molecular Evolutionary Genetics [M]. NewYork: Columbia University Press, 1987

Nybom H, Bartish IV, 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspectives in Plant Ecology*, 3: 93—114

Nybom H, 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plant [J]. *Molecular Ecology*, 13: 1143—1155

Reed DH, Frankham R, 2003. Correlation between fitness and genetic diversity [J]. *Conservation Biology*, 17: 230—237

Russell JR, Hosein F, Johnson E *et al.*, 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis [J]. *Molecular Ecology*, 2: 89—97

Wright S, 1951. The genetical structure of populations [J]. *Annals of Eugenics*, 15: 323—334

Yeh FC, Yang RC, 1999. POPGENE Version 1.31, Microsoft Window based Freeware for Population Genetic Analysis [M]. University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research

Zhang FM (张富民), Ge S (葛颂), 2002. Data analysis in population genetics. I. analysis of RAPD data with AMOVA [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), 10 (4): 438—444

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification [J]. *Genomica*, 20 (2): 176—183